



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
CONFÉDÉRATION SUISSE  
CONFEDERAZIONE SVIZZERA



### Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

### Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

### Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 15. Mai 1998

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum  
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle  
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentgesuche  
Demandes de brevet  
Domande di brevetto

*U. Kohler*

**Patentgesuch Nr. 1997 1456/97**

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels.

Patentbewerber:

Eprova AG

Im Laternenacker 5

8200 Schaffhausen

Anmeldedatum: 13.06.1997

Voraussichtliche Klassen: A61K

**nderliches Exemplar  
laire invariable  
plare immuable**

- 1 -

1456/97

EPROVA AG

CH-8200 Schaffhausen

**Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren  
Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur  
Beeinflussung des Homocystein-Spiegels**

**Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels**

5 Diese Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels, im speziellen zur Vorbeugung und Behandlung von Herz-/Kreislaufkrankungen und zur Vorbeugung von Neural-Tube-Defects.

10

Im vorliegenden Text beziehen sich Tetrahydrofolate in der natürlichen stereoisomeren Form auf 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure oder (6S)-Tetrahydrofolsäure oder deren pharmazeutisch verträglichen Salze.

15

Als Arzneimittel wurden Tetrahydrofolate bisher vorwiegend als Calcium-Salz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (Leucovorin) oder der 5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure verwendet zur Behandlung von megaloblastischer Folsäure-Anämie, als Antidot zur Verstärkung der Verträglichkeit von Folsäure-Antagonisten, speziell  
20 von Aminopterin und Methotrexat in der Krebstherapie ("Antifolate rescue"), zur Verstärkung des therapeutischen Effektes von fluorierten Pyrimidinen und der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis und rheumatischer Arthritis, zur Verstärkung der Verträglichkeit von bestimmten Antiparasitika, etwa Trimethoprim-Sulfamethoxazol sowie zur Verminderung der Toxizität von Dideazatetrahydrofolaten  
25 in der Chemotherapie.

Homocystein ist eine Thiol-enthaltende Aminosäure, die bei der Demethylierung von Methionin entsteht. In Körperflüssigkeiten liegt Homocystein in oxidierter Form als Disulfid (Homocystin), gemischte Disulfide und als cyclisiertes Oxidationsprodukt  
30 (Homocystein-Thiolacton) vor.

Hyperhomocysteinämie ist eine klinische Störung, die verschiedene angeborene oder erworbene Ursachen haben kann. Diese Störungen haben eine erhöhte Konzentration von Homocystein im Blut und im Harn zur Folge.

- Die häufigste Form von Hyperhomocysteinämie resultiert aus einem Defekt der Cystathion- $\beta$ -Synthase, einem Enzym im Transsulfurierungspfad, in dem Methionin in Cystein umgewandelt wird. Eine andere Form basiert auf einem Defekt der 5,10-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase, die das Substrat, 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, für die B<sub>12</sub>-abhängige Umwandlung von Homocystein zu Methionin liefert. Hyperhomocysteinämie kann auch als Folge von Funktionsstörungen der Leber auftreten. In all diesen Fällen bedeutet der Begriff Hyperhomocysteinämie eine vorübergehende oder permanente Erhöhung des Homocystein-Spiegels im Blut, der z. T. begleitet wird von einer erhöhten Homocystin-Ausscheidung im Harn.

Hyperhomocysteinämie hat eine Reihe von Krankheiten zur Folge, die sich in schweren vaskulären, okulären, neurologischen und skeletalen Abnormitäten zeigen.

- Verschiedene klinische Studien zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen einem erhöhten Homocystein-Level im Serum und der Entwicklung von Herz-/Kreislauferkrankungen. Homocysteinämie wird als unabhängiger Risikofaktor bei Herz-/Kreislauferkrankungen angesehen. Allgemeine Angaben können gefunden werden in K.L. Resch ed, Risikofaktor Homocystein Daten-Fakten-Strategien, Gesellschaft für Medizinische Information ISBN 3-980 45 36-0-X. Im Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und Arteriosklerose sei auf L.J. Fortin et al, Clinical Biochemistry, Vol. 28(2), 1995, Seiten 155-162 hingewiesen. Hyperhomocysteinämie und Neural-Tube-Defects wurden beschrieben von J.L. Mills et al, Supplement Publication to the Ceres-Forum on June 14, 1995, 1996, Seiten 756S-760S.

25

Die Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels wurde bisher weder vorgeschlagen noch beschrieben.

- Es wurde gefunden, dass die Verwendung von pharmazeutischen Zubereitungen enthaltend die natürliche stereoisomere Form von Tetrahydrofolaten den Homocystein-Spiegel beeinflusst.

- Die natürliche stereoisomere Form von Tetrahydrofolaten bezieht sich auf 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 10-Formyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5-Formimino-(6S)-tetrahydrofolsäure oder (6S)-Tetrahydrofolsäure oder deren pharmazeutisch verträglichen Salze. Verwendet werden reduzierte Folate, welche im Folatstoffwechsel in der Regel gegenseitig ineinander umgewandelt werden können. Bevorzugt werden aber 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure und dessen pharmazeutisch verträglichen Salze verwendet, da 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure direkt an der Übertragung der Methylgruppe von Homocystein zu Methionin beteiligt ist. Speziell gilt dies bei vorhandener Methylenetetrahydrofolat-Reduktase-Defizienz, wie z.B. bei vorhandener thermolabiler Methylenetetrahydrofolat-Reduktase. Unter diesen Umständen können Tetrahydrofolate nur beschränkt umgewandelt und damit in der Methylierungsreaktion mit eingesetzt werden.
- 15 Pharmazeutisch verträgliche Salze sollten sowohl pharmakologisch wie auch pharmazeutisch verträglich sein. Solche pharmakologisch und pharmazeutisch verträgliche Salze können Alkali- oder Erdalkalimetall-Salze sein, vorzugsweise Natrium-, Kalium-, Magnesium oder Calcium-Salze.
- 20 Pharmazeutische Zubereitungen beziehen sich auf enterale (z. B. oral, sublingual oder rektal), parenterale oder topische (z. B. transdermale) Formen. Als Träger können organische oder anorganische Substanzen verwendet werden, die nicht mit der aktiven Wirksubstanz reagieren, z. B. Wasser, Öl, Benzylalkohol, Polyethylenglycol, Glycerintriacetat oder andere Fettsäureglyceride, Gelatine, Lecithin, Cyclo-
- 25 dextrine, Kohlenhydrate wie Lactobiose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk oder Cellulose. Bevorzugt bei der oralen Anwendung sind Tabletten, Dragées, Kapseln, Pulver, Sirup, Konzentrate oder Tropfen, für die rektale Anwendung bevorzugt sind Zäpfchen, zur parenteralen Anwendung bevorzugt eingesetzt werden Lösungen, wasser- oder ölbasierend oder Lyophilisate.
- 30 Ebenfalls anwendbar sind Suspensionen, Emulsionen oder Implantate und für die topische Anwendung Pflaster oder Cremes.

Pharmazeutische Zubereitungen für die parenterale Anwendung beinhalten sterile wässrige und nichtwässrige Injektionslösungen der pharmazeutisch aktiven Verbindungen, die vorzugsweise isotonisch zum Blut des Empfängers sind.

- 5 Diese Zubereitungen können Stabilisatoren, Additive für die kontrollierte Freisetzung der pharmazeutisch aktiven Verbindungen, Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatikas und Hilfsstoffe zur Einstellung einer isotonischen Lösung beinhalten. Wässrige und nichtwässrige sterile Suspensionen können Suspensionszusatzstoffe und Verdickungsmittel beinhalten. Die pharmazeutische Zubereitung kann als Einfachdosis-  
10 oder als Mehrfachdosis-Behälter vorhanden sein, zum Beispiel als verschweisste Ampullen und kann als gefriergetrocknetes (lyophilisiertes) Produkt gelagert und bei Bedarf mit steriler Flüssigkeit, zum Beispiel Wasser oder Salzlösung für den Gebrauch vorbereitet werden. In derselben Art und Weise können auch steriles  
15 Pulver, Granulat oder Tabletten verwendet werden. Alle pharmazeutischen Zubereitungen können zusätzlich separat oder synergistisch wirkende aktive Verbindungen enthalten.

- Die pharmazeutische Zubereitung beinhaltet zwischen 0.001 mg und 1'000 mg der aktiven Wirksubstanz pro Dosis. In der Prophylaxe werden Zubereitungen enthaltend  
20 vorzugsweise zwischen 5 µg und 1'000 µg der aktiven Wirksubstanz pro Dosis eingesetzt. In der Therapie werden Zubereitungen enthaltend vorzugsweise zwischen 0.1 mg und 100 mg der aktiven Wirksubstanz pro Dosis eingesetzt.

- Die Dosierung hängt ab von der Therapieform, von der Anwendungsform der  
25 pharmazeutischen Zubereitung, vom Alter, Gewicht, der Ernährung und Zustand des Patienten. Die Behandlung kann mit tiefer Dosierung unterhalb der optimalen Menge begonnen und bis zur Erreichung des optimalen Effektes gesteigert werden. Bevorzugt kann sich die Dosierungen in der Prophylaxe zwischen 5 µg und 1'000 µg pro Tag, im speziellen zwischen 50 µg und 500 µg pro Tag bewegen. Optimale Dosierungen  
30 in der Therapie bewegen sich zwischen 0.1 mg und 100 mg pro Tag, im speziellen zwischen 0.5 mg und 5 mg pro Tag. Die Anwendung kann entweder als Einmalgabe oder als wiederholte Dosierung erfolgen.

### Beispiele zur Illustrierung der Erfindung

#### **Beispiel 1**

5

#### **Tablette enthaltend 1 mg 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure**

Eine Mischung von 13.3 g 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure-Calciumsalz-Pentahydrat (entsprechend 10 g 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure), 4 kg Lactose, 1.2 kg Stärke, 10 0.2 kg Talk und 0.1 kg Magnesiumstearat werden zu Tabletten gepresst, so dass jede Tablette 1 mg 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure enthält.

Die Tablette kann beschichtet als Filmtablette oder gemahlen und in Kapseln abgefüllt verwendet werden.

15

#### **Beispiel 2**

#### **Zäpfchen enthaltend 60 mg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure**

20

Eine Mischung von 632 g 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure-Calciumsalz-Pentahydrat (entsprechend 500 g 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure), 50 g Hydroxypropylcellulose und 2 kg semisynthetische Glyceride werden zu Suppositorien geschmolzen, so dass jedes Zäpfchen 500 mg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure enthält.

25

#### **Beispiel 3**

#### **Injektionslösung enthaltend 0.5 mg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure**

30

0.5 g 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 10 g Glutathion, 30 g Zitronensäure, 160 g Mannitol, 1 g Methyl-p-hydroxybenzoesäure, 17.7 g Natriumhydroxid (oder die notwendige Menge um einen pH-Wert der Lösung von 7.3 bis 7.8 einzustellen) werden



auf 3 Liter Wasser zur Injektion gelöst und in Ampullen abgefüllt, so dass jede Ampulle 0.5 mg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure enthält.

5 **Beispiel 4**

**Injizierbares Lyophilisat enthaltend 1 mg (6S)-Tetrahydrofolsäure**

10 Eine Lösung von 1 g (6S)-Tetrahydrofolsäure-Natriumsalz in 1'000 ml doppelt destilliertem Wasser wird in Ampullen sterilfiltriert und lyophilisiert, so dass jede Ampulle 1 mg (6S)-Tetrahydrofolsäure enthält.

15 Tetrahydrofolsäure ist sehr sauerstoffempfindlich, daher muss strikte sauerstoff-frei gearbeitet werden. Der Einsatz eines Oxidationsschutzmittels wie Ascorbinsäure kann notwendig sein.

**Beispiel 5**

20 **Injizierbares Lyophilisat enthaltend 20 mg 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure**

25 Eine Lösung von 10 g  $\beta$ -Hydroxypropyl-Cyclodextrin-Einschlussverbindung von 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure-Natriumsalz in 2'000 ml doppelt destilliertem Wasser wird in Ampullen sterilfiltriert, so dass jede Ampulle 20 mg 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure enthält.

Für 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure gelten die gleichen Vorsichtsmassnahmen wie für Tetrahydrofolsäure (Beispiel 4).

### Beispiel 6

#### Tablette enthaltend 0.4 mg 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure

- 5 Eine Mischung von 5.32 g 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure-Calciumsalz-Pentahydrat (entsprechend 4 g 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure), 4 kg Lactose, 1.2 kg Stärke, 0.2 kg Talk und 0.1 kg Magnesiumstearat werden zu Tabletten gepresst, so dass jede Tablette 4 mg 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure enthält.
- 10 Die Tablette kann beschichtet als Filmdrücke oder gemahlen und in Kapseln abgefüllt verwendet werden.

### Beispiel 7

15

#### Injizierbares Lyophilisat enthaltend 10 µg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure

- Eine Lösung von 10 mg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure-Natriumsalz in 1'000 ml doppelt destilliertem Wasser wird unter Schutzgas in Ampullen sterilfiltriert und
- 20 lyophilisiert, so dass jede Ampulle 10 µg 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure enthält.

Tetrahydrofolsäure ist sehr sauerstoffempfindlich, daher muss strikte sauerstoff-frei gearbeitet werden. Der Einsatz eines Oxidationsschutzmittels wie Ascorbinsäure kann notwendig sein.

25

### Patentansprüche

1. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels.
2. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Vorbeugung und Behandlung von Herz-/Kreislaufferkrankungen.
3. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Vorbeugung von Neural-Tube-Defects.
4. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form gemäss den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Tetrahydrofolat 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 10-Formyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5-Formimino-(6S)-tetrahydrofolsäure oder (6S)-Tetrahydrofolsäure, oder deren pharmazeutisch verträgliche Salze eingesetzt werden.
5. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form gemäss den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Tetrahydrofolat 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure eingesetzt wird.
6. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form gemäss den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Tetrahydrofolat 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure eingesetzt wird und die Anwendung bei vorhandener Methylentetrahydrofolat-Reductase-Defizienz erfolgt.

7. Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form gemäss den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Tetrahydrofolat 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure eingesetzt wird und die Anwendung bei vorhandener thermolabiler Methylentetrahydrofolat-Reductase erfolgt.
8. Pharmazeutische Zubereitungen zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels dadurch gekennzeichnet, dass sie als aktive Wirksubstanz mindestens eine Verbindung beinhaltet, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 10-Formyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5-Formimino-(6S)-tetrahydrofolsäure oder (6S)-Tetrahydrofolsäure oder deren pharmazeutisch verträglichen Salze, zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoffen.
9. Pharmazeutische Zubereitungen zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels bei vorhandener thermolabiler Methylentetrahydrofolat-Reductase, dadurch gekennzeichnet, dass sie als aktive Wirksubstanz 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Wirk- und Hilfsstoffen beinhaltet.

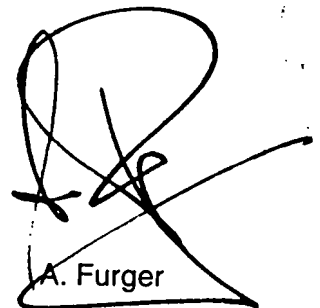
### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Tetrahydrofolaten in der natürlichen stereoisomeren Form zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung geeignet zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels, im speziellen zur Vorbeugung und Behandlung von Herz-/Kreislaufkrankungen und zur Vorbeugung von Neural-Tube-Defects.

Ebenfalls betrifft die Erfindung pharmazeutische Zubereitungen beinhaltend mindestens eine Verbindung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 10-Formyl-(6R)-tetrahydrofolsäure, 5-Formimino-(6S)-tetrahydrofolsäure oder (6S)-Tetrahydrofolsäure oder deren pharmazeutisch verträglichen Salze, zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Wirk- und Hilfsstoffen, zur Beeinflussung des Homocystein-Spiegels, speziell bei vorhandener Methylentetrahydrofolat-Reductase-Defizienz wie z.B. bei vorhandener thermolabiler Methylentetrahydrofolat-Reductase.

E P R O V A   A G

  
T. Suter

  
A. Furger

In re application of  
Hans Rudolf MÜLLER et al  
S.N. 09/095,572  
Filed June 11, 1998  
G/A Unit 1614  
Atty Docket EPROV 13

LAW OFFICES  
MILLEN, WHITE, ZELANO  
& BRANIGAN, P.C.  
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA I  
2200 CLARENDON BOULEVARD  
ARLINGTON, VIRGINIA 22201

UNITED STATES OF AMERICA

DECLARATION

I, Dr A J Wickens, of 24 Honeypots Road, Mayford, Woking, Surrey, GU22 9QW, England, do hereby declare that I am fully conversant with the English and German languages and that to the best of my knowledge and belief the following is a true translation made by me into the English language of the Swiss priority document of Swiss Patent Application No. 1997 1456/97 in the name of Eprova AG.

Signed this

18<sup>th</sup>

day of

June

1998

A. J. Wickens

## SWISS CONFEDERATION

### Certificate

The attached records correspond to the original technical documents of the patent application for Switzerland and Liechtenstein specified on the next page. Switzerland and the Principality of Liechtenstein form a unitary patent protection territory. Application for patent protection can therefore only be made for both countries jointly.

Bern, 15 May 1998

Federal Institute for Intellectual Property  
Patent Applications

(Signed)

*[SEAL ATTACHED: FEDERAL INSTITUTE FOR INTELLECTUAL PROPERTY]*



**Patent Application No. 1997 1456/97**

**CERTIFICATE OF FILING (Article 46 Section 5 of the Patent Regulations)**

The Federal Institute for Intellectual Property certifies the receipt of the Swiss Patent Application described in more detail below.

**Title:**

The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for influencing the homocysteine level

**Applicant:**

Eprova AG  
Im Laternenacker 5  
8200 Schaffhausen

Filing date: 13.06.1997

Provisional classes: A61K

**Unalterable copy**

EPROVA AG

CH-8200 Schaffhausen

**The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for influencing the homocysteine level**

**The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for influencing the homocysteine level**

This invention relates to the use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for influencing the homocysteine level, particularly for the prevention and treatment of cardiovascular diseases and the prevention of neural tube deficiencies.

In the present text, the expression "tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form" refers to 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid or (6S)-tetrahydrofolic acid or pharmaceutically compatible salts thereof.

As drugs, tetrahydrofolates have predominantly been used hitherto as the calcium salt of 5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (leucovorin) or of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid for the treatment of megaloblastic folic acid deficiency anemia, as an antidote for increasing the compatibility of folic acid antagonists, particularly of aminopterin and methotrexate in cancer therapy ("antifolate rescue"), for increasing the therapeutic effect of fluorinated pyrimidines and for the treatment of autoimmune diseases such as psoriasis and rheumatoid arthritis, for increasing the compatibility of certain antiparasitic agents, for instance trimethoprim-sulfamethoxazole, and for decreasing the toxicity of dideaza-tetrahydrofolates in chemotherapy.

Homocysteine is a thiol-containing amino acid which is formed on the demethylation of methionine. In body fluids, homocysteine exists in oxidised form as a disulphide (homocystine), as mixed disulphides and as a cyclised oxidation product (homocysteine thiolactone).

Hyperhomocysteinemia is a clinical disorder which may have various congenital or acquired causes. These disorders result in an increased concentration of homocysteine in the blood and in the urine.

5 The commonest form of hyperhomocysteinemia results from a deficiency of cystathione  $\beta$ -synthase, an enzyme involved in the  $B_6$ -dependent transulphuration pathway, in which homocysteine is converted into cysteine. Another form is due to a deficiency of 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase, which provides the substrate, 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, for the  $B_{12}$ -dependent conversion of homocysteine to methionine. Hyperhomocysteinemia can also occur as a consequence of functional disorders of the liver.

10 In all these cases, the term "hyperhomocysteinemia" refers to a temporary or permanent increase in the homocysteine level in the blood, which is sometimes accompanied by an increased urinary secretion of homocysteine.

Hyperhomocysteinemia results in a series of diseases, which are manifested in severe vascular, ocular, neurological and skeletal disorders.

15 Various clinical studies have shown a clear connection between an increased homocysteine level in the serum and the development of cardiovascular diseases. Homocysteinemia is considered to be an independent risk factor in cardiovascular diseases. General information can be found in K.L. Resch (ed.), Risikofaktor Homocystein Daten-Fakten-Strategien [*Homocysteine Risk Factor - Data-Facts-Strategies*], Gesellschaft für Medizinische

20 Information ISBN 3-980 45 36-0-X. Reference is made to L.J. Fortin et al, Clinical Biochemistry, Vol. 28(2), 1995, pages 155-162 as regards the relationship between hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis. Hyperhomocysteinemia and neural tube deficiency have been described by J.L. Mills et al, Supplement Publication to the Ceres Forum on June 14, 1995,1996, pages 756S-760S.

25 The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for influencing the homocysteine level has neither been proposed nor described hitherto.

It has been found that the use of pharmaceutical preparations containing the natural stereoisomeric form of tetrahydrofolates influences the homocysteine level.

The natural stereoisomeric form of tetrahydrofolates refers to 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methenyl-(6R)-tetrahydrofolic acid, 10-formyl-(6R)-tetrahydrofolic acid, 5-formimino-(6S)-tetrahydrofolic acid or (6S)-tetrahydrofolic acid or pharmaceutically compatible salts thereof. Reduced folates are used, which as a rule can generally be mutually transformed into one another in the folate metabolism. 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid and the pharmaceutically compatible salts thereof are preferably used, however, since 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid is directly involved in the transfer of the methyl group of homocysteine to methionine. This applies in particular when there is an existing methylene tetrahydrofolate reductase deficiency, such as when thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase exists, for example. Under these circumstances, tetrahydrofolates can only be converted to a limited extent and can thus only be used in conjunction in the methylation reaction to a limited extent.

Pharmaceutically compatible salts should be both pharmacologically and pharmaceutically compatible. Pharmacologically and pharmaceutically compatible salts such as these may be alkali or alkaline earth metal salts, preferably sodium, potassium, magnesium or calcium salts.

The expression "pharmaceutical preparations" refers to enteral (e.g. oral, sublingual or rectal), parenteral or topical (e.g. transdermal) forms. Organic or inorganic substances which do not react with the active ingredient can be used as supports, e.g. water, oil, benzyl alcohol, polyethylene glycol, glycerol triacetate or other fatty acid glycerides, gelatine, lecithin, cyclodextrin, carbohydrates such as lactobiose or starch, magnesium stearate, talc or cellulose. Tablets, dragees, capsules, powders, syrup concentrates or drops are preferred for oral application, suppositories are preferred for rectal application, and water- or oil-based solutions or lyophilisates are preferably used for parenteral application.

Suspensions, emulsions or implants can also be used, and patches or creams can be used for topical application.

5      Pharmaceutical preparations for parenteral application comprise sterile aqueous and non-aqueous injection solutions of the pharmaceutically-active compounds, which are preferably isotonic with the blood of the recipient.

10      These preparations may comprise stabilisers, additives for the controlled release of the pharmaceutically-active compounds, antioxidants, buffers, bacteriostatic agents and adjuvant substances for obtaining an isotonic solution. Aqueous and non-aqueous sterile suspensions may contain suspension additives and thickeners. The pharmaceutical preparation may exist as a single dose- or as a multiple-dose container, as sealed ampoules for example, and may be stored as a freeze-dried (lyophilised) product and prepared for use if need be with a sterile liquid, for example water or salt solution. Sterile powders, 15 granules or tablets can also be used in the same manner. All the pharmaceutical preparations may additionally contain active compounds which act separately or synergistically.

20      The pharmaceutical preparation contains between 0.001 mg and 1000 mg of the active ingredient per dose. In prophylaxis, preparations are used which preferably contain between 5 µg and 1000 µg of the active ingredient per dose. In therapy, preparations are used which preferably contain between 0.1 mg and 100 mg of the active ingredient per dose.

25      The dosage depends on the form of therapy, on the form of application of the pharmaceutical preparation, and on the age, weight, nutrition and condition of the patient. Treatment may be commenced with a low dosage below the optimum amount and this may be increased until the optimum effect is achieved. The dosages used in prophylaxis may preferably vary between 5 µg and 1000 µg per day, particularly between 50 µg and 500 µg per day. Optimum dosages in therapy vary between 0.1 mg and 100 mg per day,

- 6 -

particularly between 0.5 mg and 5 mg per day. Application may be effected as a single administration or as a repeated dosage.

### **Examples to illustrate the invention**

#### **Example 1**

##### **5    A tablet containing 1 mg 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid**

A mixture of 13.3 g of the pentahydrate of the calcium salt of 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid (corresponding to 10 g 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid), 4 kg lactose, 1.2 kg starch, 0.2 kg talc and 0.1 kg magnesium stearate is pressed to form tablets, so that each  
10    tablet contains 1 mg 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid.

The tablet can be coated as a film tablet or can be ground and used in capsule form.

#### **15    Example 2**

##### **A suppository containing 60 mg 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid**

A mixture of 632 g of the pentahydrate of the calcium salt of 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid (corresponding to 500 g 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid), 50 g hydroxy-propylcellulose and 2 kg of semisynthetic glycerides is melted to form suppositories, so that  
20    each suppository contains 500 mg 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid.

#### **25    Example 3**

##### **An injection solution containing 0.5 mg 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid**

0.5 g 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 10 g glutathione, 30 g citric acid, 160 g mannitol,  
30    1 g methyl-p-hydroxybenzoic acid, 17.7 g sodium hydroxide (or the requisite amount in



order to obtain a pH of the solution of 7.3 to 7.8) are dissolved in 3 litres of water for injection and introduced into ampoules, so that each ampoule contains 0.5 mg 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid.

5

#### **Example 4**

##### **An injectable lyophilisate containing 1 mg (6S)-tetrahydrofolic acid**

- 10 A solution of 1 g of the sodium salt of (6S)-tetrahydrofolic acid in 1000 ml double-distilled water is introduced via sterile filtration into ampoules and lyophilised, so that each ampoule contains 1 mg (6S)-tetrahydrofolic acid.

- 15 Tetrahydrofolic acid is very sensitive to oxygen, and stringently oxygen-free conditions therefore have to be employed. The use of an antioxidant such as ascorbic acid may be necessary.

#### **Example 5**

20

##### **An injectable lyophilisate containing 20 mg 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid**

- 25 A solution of 10 g of the  $\beta$ -hydroxypropyl-cyclodextrin inclusion compound of the sodium salt of 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid in 2000 ml of double-distilled water is introduced via sterile filtration into ampoules, so that each ampoule contains 20 mg 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid.

- 30 The same precautionary measures apply to 5,10-methylene-tetrahydrofolic acid as for tetrahydrofolic acid (Example 4).

### Example 6

#### A tablet containing 0.4 mg 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid

5 A mixture of 5.32 g of the pentahydrate of the calcium salt of 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid (corresponding to 4 g 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid), 4 kg lactose, 1.2 kg starch, 0.2 kg talc and 0.1 kg magnesium stearate is pressed to form tablets, so that each tablet contains 4 mg 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid.

10 The tablet can be coated as a film tablet or can be ground and used in capsule form.

### Example 7

#### 15 An injectable lyophilisate containing 10 µg 6-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid

A solution of 10 mg of the sodium salt of 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid in 1000 ml of double-distilled water is introduced, via sterile filtration under an inert gas, into ampoules  
20 and lyophilised, so that each ampoule contains 10 µg 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid.

Tetrahydrofolic acid is very sensitive to oxygen, and stringently oxygen-free conditions therefore have to be employed. The use of an antioxidant such as ascorbic acid may be necessary.

25

## **Claims**

1. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for influencing the homocysteine level.
2. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for the prevention and treatment of cardiovascular diseases.
3. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form for the production of a pharmaceutical preparation suitable for the prevention of neural tube deficiencies.
4. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form according to claims 1 to 3, characterised in that 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methenyl-(6R)-tetrahydrofolic acid, 10-formyl-(6R)-tetrahydrofolic acid, 5-formimino-(6S)-tetrahydrofolic acid or (6S)-tetrahydrofolic acid, or pharmaceutically compatible salts thereof, are used as a tetrahydrofolate.
5. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form according to claims 1 to 3, characterised in that 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid or a pharmaceutically compatible salt of 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid is used as a tetrahydrofolate.
6. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form according to claims 1 to 3, characterised in that 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid or a pharmaceutically compatible salt of 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid is used as a tetrahydrofolate, and application is effected when a methylene tetrahydrofolate reductase deficiency exists.

7. The use of tetrahydrofolates in natural stereoisomeric form according to claims 1 to 3, characterised in that 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid or a pharmaceutically compatible salt of 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid is used as a tetrahydrofolate and application is effected when thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase exists.
8. Pharmaceutical preparations for influencing the homocysteine level, characterised in that they contain, as an active ingredient, at least one compound which is selected from the group consisting of 5-formyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methylene-(6R)-tetrahydrofolic acid, 5,10-methenyl-(6R)-tetrahydrofolic acid, 10-formyl-(6R)-tetrahydrofolic acid, 5-formimino-(6S)-tetrahydrofolic acid or (6S)-tetrahydrofolic acid or pharmaceutically compatible salts thereof, together with pharmaceutically compatible adjuvant substances.
9. Pharmaceutical preparations for influencing the homocysteine level when thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase exists, characterised in that they contain, as an active ingredient, 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid or a pharmaceutically compatible salt of 5-methyl-(6S)-tetrahydrofolic acid, together with pharmaceutically compatible active and adjuvant substances.